

**AUTORADIOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON  
GLOBIN - BIOSYNTHESEERATEN  
EIN DIAGNOSTISCHES VERFAHREN BEI  
THALASSÄMIEN**

**MANUELA WEISSGERBER**

**1987**

Disbui. München







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554822\\_0112](https://archive.org/details/IA41554822_0112)

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

AUTORADIOGRAPHISCHE BESTIMMUNG VON GLOBIN - BIOSYNTHESE-RATEN  
EIN DIAGNOSTISCHES VERFAHREN BEI THALASSÄMIEN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

an der LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
MANUELA WEISSGERBER

aus München

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Jensen

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heinz Spiess

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 12. 1987

## Meinen Eltern

Meine Eltern, ich danke Euch sehr für die Liebe und Fürsorge, die Ihr mir entgegenbringt. Ich bin sehr glücklich, dass ich bei Euch sein darf und hoffe, dass ich Euch bald wieder besuchen darf.

Ich habe Euch sehr lieb und hoffe, dass Ihr auch mich sehr liebt. Ich werde mich sehr bemühen, Euch zu gefallen und hoffe, dass ich Euch bald wieder besuchen darf.



Meinem Doktorvater, Herrn Prof.Dr.med. Jensen sage ich herzlichen Dank für die Überlassung des Themas und für seine stete, wertvolle Unterstützung.

Frau Heidi Ritzerfeld danke ich für ihre unentbehrliche Hilfe bei der experimentellen Laborarbeit.



# INHALTSVERZEICHNIS

## Seite

### 1. Einleitung

|     |                                                     |   |
|-----|-----------------------------------------------------|---|
| 1.1 | Globinsynthesestörung bei der $\beta$ - Thalassämie | 1 |
| 1.2 | Diagnostik der heterozygoten $\beta$ - Thalassämie  | 1 |
| 1.3 | Fragestellung                                       | 3 |

### 2. Material und Methoden

|       |                                                                        |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1   | Untersuchte Patientinnen                                               | 6  |
| 2.2   | Globinsynthese in vitro                                                | 6  |
| 2.2.1 | Inkubation der Erythrozyten zur radioaktiven<br>Markierung der Globine | 6  |
| 2.2.2 | Gewinnung des Globins                                                  | 7  |
| 2.2.3 | Elektrophorese                                                         | 8  |
| 2.2.4 | Färbung                                                                | 9  |
| 2.2.5 | Bestimmung der Radioaktivität                                          | 10 |
| 2.3   | Gehalt an $\alpha$ - und $\beta$ - Globin in den Erythrozyten          | 11 |

### 3. Ergebnisse

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Globinsynthese in vitro                                    | 12 |
| 3.2 Gehalt der Erythrozyten an $\alpha$ - und $\beta$ - Globin | 16 |

### 4. Diskussion

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1 Beurteilung der Meßmethode zur Bestimmung der<br>Globinsyntheserate    | 19 |
| 4.2 Vergleich zwischen Globingehalt und Globinsynthese<br>der Erythrozyten | 24 |

### 5. Zusammenfassung 28

### 6. Literaturverzeichnis 29

### Lebenslauf 36

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Globinsynthesestörung bei der $\beta$ -Thalassämie

Das Hämoglobin ist ein zusammengesetztes Protein, das über 90% der Trockensubstanz des normalen menschlichen Erythrozyten ausmacht. Es ist ein kugelförmiges Molekül bestehend aus 4 Proteinuntereinheiten, den Globinketten, von denen jede einen Hämanteil gebunden trägt. Von den 4 Polypeptidketten sind bei den verschiedenen Hämoglobinen jeweils zwei identisch.

Über 90% des Hämoglobins des gesunden Erwachsenen bestehen aus Hb A<sub>1</sub>, das aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ketten zusammen gesetzt ist. Das Hb A<sub>2</sub> aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\delta$ -Ketten macht etwa 2,5% des Hämoglobins beim Erwachsenen aus. In geringen Mengen ist außerdem noch HbF aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\gamma$ - Ketten vorhanden, das in der Fetalzeit die Hauptmenge des Hämoglobins darstellt.

Unter dem Begriff "Thalassämie" ist eine Gruppe hereditärer Anämieformen zusammengefaßt, denen eine Synthesestörung einer der Polypeptidkettenarten des Globinanteils im Hämoglobin zugrunde liegt.

Es ist möglich, den Pathomechanismus der Thalassämie in den Retikulozyten des peripheren Blutes nachzuweisen, die noch 24 - 48 Stunden nach der Ausschwemmung aus dem Knochenmark zur Proteinsynthese fähig sind (5). Seit den Arbeiten von KESSENAAR, LONDON, KRUH, und BORSOOK (27, 28) weiß man, daß sich radioaktiv markierte Aminosäuren bei in vitro Inkubation in das Hämoglobin von Erythrozyten einbauen lassen, wenn der Anteil an Retikulozyten ausreichend hoch ist. Erste Versuche, mit dieser Methode die Globinsynthese bei Thalassämiepatienten zu untersuchen, wurden von MARKS UND BURKA (30, 31) und



HEYWOOD (21) unternommen. Das Ziel war es, die radioaktiv markierten Globinketten zu trennen und das relative Verhältnis von  $\alpha$  - Ketten zu  $\beta$  - Ketten synthese zu bestimmen. Jedoch waren die Methoden zur Globinkettentrennung sehr aufwendig und das relativ geringe Globinmaterial einer normalen Blutprobe (10 - 20 ml) war für deutliche und quantifizierbare Ergebnisse nicht ausreichend.

1965 entwickelten CLEGG, NAUGHTON und WEATHERALL (11) eine Methode, die es ermöglichte, die einzelnen Globinketten durch Säulenchromatographie an Carboxymethylzellulose zu trennen, mit einer Globinausbeute von über 95%. Mit dieser Methode lassen sich auch kleine Globinmengen trennen und quantitativ untersuchen.

Nach in vitro Inkubation der Erythrozyten mit radioaktiv markierten Aminosäuren dient das Ausmaß der Inkorporation des radioaktiven Materials in die Globinketten als Maß für deren Synthese während der Inkubation. Als Aminosäure für die radioaktive Markierung ist besonders Leucin geeignet, da es in  $\alpha$  - und  $\beta$  - Ketten in genau gleicher Menge, 18 mal pro Kette enthalten ist.

Mit Hilfe der Methode von CLEGG et al (11) konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß bei der Thalassämie eine unbalancierte Globinkettensynthese vorliegt. Die Globinketten werden in unveränderter Struktur, aber geringerer Menge produziert. Während in normalen Erythrozyten  $\alpha$  - und  $\beta$ -Ketten im Verhältnis 1:1 synthetisiert werden, ist bei Retikulozyten von Thalassämiepatienten eine deutliche Verringerung der  $\alpha$  - Fraktion bei der  $\alpha$ -Thalassämie, bzw. der  $\beta$ -Fraktion bei der  $\beta$ -Thalassämie zu erkennen (3, 46). Bei der  $\beta$ -Thalassämie, auf die sich die Untersuchungen dieser Arbeit beziehen, variiert das  $\beta/\alpha$  -Verhältnis bei homozygoten Patienten zwischen dem Extrem der nicht nachweisbaren  $\beta$ -Kettensynthese bei der  $\beta^0$ -

Thalassämie und Werten zwischen 0,1 und 0,3 bei der  $\beta^+$ -Thalassämie (3, 4, 14, 22). Bei heterozygot Betroffenen finden sich  $\beta/\alpha$  -Werte zwischen 0,3 und 0,8 (13, 24, 25, 39).

## 1.2 Diagnostik der heterozygoten $\beta$ -Thalassämie

Während die homozygote Thalassämie ein schweres Krankheitsbild darstellt, das meist bereits im ersten Lebensjahr diagnostiziert wird, ist das klinische Bild bei heterozygoten Patienten sehr variabel. Es kann eine chronische Anämie mit Splenomegalie und Skelettveränderungen vorliegen, jedoch ist die überwiegende Anzahl der Betroffenen klinisch unauffällig (48). Eigentlich würde daher die Diagnose der heterozygoten Thalassämie nur durch Zufall entdeckt und wäre selten von Bedeutung, wenn es nicht darum ginge, die Geburt eines homozygot kranken Kindes von zwei heterozygot betroffenen Eltern zu verhindern.

In vielen Gebieten mit einer hohen Inzidenz heterozygoter Merkmalsträger werden Populationsscreeningprogramme angeboten, um klinisch symptomfreie Träger zu erkennen (41, 42). Es wird damit eine genetische Beratung betroffener Paare ermöglicht. Bei einer Schwangerschaft eines solchen Paares gibt es die Möglichkeit, pränatal durch fetale Blutentnahmen unter fetoskopischer Kontrolle festzustellen, ob das Kind homozygot erkrankt sein wird, zu einem Zeitpunkt, bei dem ein Schwangerschaftsabbruch noch möglich ist (1, 2, 23, 34).

In der Regel kann die Diagnose der heterozygoten  $\beta$ -Thalassämie gestellt werden anhand der Erythrozytenparameter und einer Hämoglobinelektrophorese. Bei den Patienten findet man eine hypochrome mikrozytäre Anämie und einen erhöhten Hb  $A_2$ -Wert. Während beim Gesunden das Hb  $A_2$  2,3 + 0,43% ausmacht, ist es

bei Patienten mit heterozygoter  $\beta$ -Thalassämie auf  $5,1 + 0,5\%$  erhöht (18).

In einigen Fällen jedoch sind diese Methoden unzureichend. Z.B. führt ein zusätzlich vorliegender Eisenmangel zu falsch niedrigen Hb A<sub>2</sub>-Werten (25, 45). Bei der  $\delta\beta$ -Thalassämie ist auch die Synthese der  $\delta$ -Ketten beeinträchtigt, so daß kein Anstieg des Hb A<sub>2</sub> erfolgen kann. Außerdem sind Fälle von "silent"  $\beta$ -Thalassämie bei Heterozygoten beschrieben, die in Erythrozytenparametern und Hämoglobinelektrophorese unauffällig waren und nur durch die Geburt eines homozygot kranken Kindes entdeckt wurden (26, 38)

Für eine sichere Diagnosestellung, wie sie etwa bei einer genetischen Beratung unumgänglich ist, kann daher eine Bestimmung der relativen Syntheserate von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinen nach der Methode von CLEGG et al. (11) notwendig werden. Dies ist die Methode mit der größten Aussagekraft und Eindeutigkeit in der Diagnostik der Thalassämie.

### 1.3 Fragestellung

Die säulenchromatographische Auftrennung der Globine zur Bestimmung der relativen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Syntheseraten in Retikulozyten ist zeitlich und technisch sehr aufwendig. Das Anliegen dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob ein einfacheres Verfahren existiert, das vergleichbar zuverlässige Ergebnisse liefert.

Nach einer Proteinsynthese in vitro mit radioaktiv markierten Aminosäuren wurden die Globine durch Gelelektrophorese getrennt, die Messung der inkorporierten Radioaktivität erfolgte durch Autoradiographie. Die ermittelten Ergebnisse wurden mit den bereits vorliegenden Ergebnissen nach säulenchromatographischer Trennung der Globine und Auswertung der inkorporierten Radioaktivität im Szintillationszähler verglichen.

Im Weiteren wurde in den Erythrozyten des peripheren Blutes der Gesamtgehalt des Blutes an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin gemessen. Das heißt, es wurde die Menge an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin in den reifen Erythrozyten ermittelt, die ihre Fähigkeit zur Globinsynthese verloren haben. Ziel war es, die Globinsyntheseleistung der Retikulozyten, die mengenmäßig einen sehr kleinen Teil der Erythrozyten ausmachen, mit dem Gesamtglobingehalt der reifen Erythrozyten zu vergleichen. Eigentlich wäre zu erwarten, daß ein Ungleichgewicht in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinsynthese, wie es in den Retikulozyten meßbar ist, zu einem unausgewogenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globingehalt in den ausgereiften Erythrozyten führt. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Diagnose der heterozygoten  $\beta$ -Thalassämie bereits aus dem peripheren Blut, ohne aufwendige Globinsynthesebestimmung, gestellt werden kann.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Untersuchte Patientinnen

Es wurden Blutproben von 20 Frauen untersucht, die alle bereits ein homozygot an  $\beta$ -Thalassämie erkranktes Kind geboren hatten und deshalb heterozygote Merkmalsträger für diese Erkrankung sein müssen. Die säulenchromatographische Bestimmung der relativen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinsyntheseraten war bei allen Frauen durchgeführt worden und erbrachte jedesmal den Nachweis der heterozygoten  $\beta$ -Thalassämie.

### 2.2 Globinsynthese in vitro

#### 2.2.1 Aufbereitung der Erythrozyten

Da die Fähigkeit zur Globinsynthese in vitro nur kurzfristig erhalten bleibt, wurden die Blutproben sofort nach der Entnahme verarbeitet.

Die Erythrozyten wurden mit Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (KRP)<sup>1</sup> gewaschen, um im Serum vorhandenes Leucin zu entfernen,

#### 1 Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (KRP)

|                                                    |                    |
|----------------------------------------------------|--------------------|
| 0,9 % NaCl                                         | 100 Teile          |
| 1,15% KCl                                          | 4 Teile            |
| 0,61% $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 3 Teile            |
| 3,82% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 1 Teil             |
| 1,42% $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                    | pH 7,4    285 mOsm |

das die spezifische Aktivität des später hinzugegebenen radioaktiven Leucins verdünnen würde. Anschließend wurden die Zellsuspensionen auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und die Gesamtzellzahl durch Zählen eines Tropfens in der Zählkammer berechnet.

Nach Zentrifugation für drei Minuten bei 3000 U/min wurde der Überstand abgesaugt und die Erythrozyten in der Inkubationslösung<sup>1</sup> aufgeschwemmt, die 50 µCi radioaktives Leucin<sup>2</sup> enthielt. Die Ansätze wurden bei 37° C inkubiert.

Die Inkubation wurde nach zwei Stunden durch viermaliges Waschen der Erythrozyten in kalter physiologischer Kochsalzlösung unterbrochen.

## 2.2.2 Gewinnung des Globins

Die Erythrozyten wurden hämolysiert durch Zusatz des fünffachen Volumens 0,005 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung, anschließend wurde 20 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand

### 1 Inkubationslösung (für 0,5 - 1 ml gepackte Erythrozyten)

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| Aminosäurelösung                | 0,04 ml  |
| (19 AS, kein Leu, jede 0,005 M) |          |
| KRP                             | 1 ml     |
| Dialysiertes AB-Plasma          | 1 ml     |
| Glukose                         | 4 mg     |
| Leucin - <sup>3</sup> H         | 0,05 mCi |

2 L-Leucin - <sup>3</sup>H, NET, New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA

wurde weiterverarbeitet, der Bodensatz verworfen.

Nach der Methode von Clegg et al. (12) wurde aus Hämoglobin Globin hergestellt: Hämoglobin wird durch Eintropfen in 2% HCl in Aceton von  $-20^{\circ}\text{C}$  präzipitiert. Das Häm-freie Präzipitat wird dreimal in kaltem Aceton gewaschen und unter Stickstoff getrocknet.

### 2.2.3 Elektrophorese

Die Trennung der Globine erfolgte nach der von ROVERA beschriebenen Methode (37) auf Triton-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen. Zu einem Gemisch aus 28,1 ml 8 M Harnstofflösung und 7,5 ml Acrylamid-Bis-Lösung (60 g Acrylamid und 0,4 g Bisacrylamid pro 100 ml Aqua dest.) wurden 0,188 ml TMED (Tetramethyläthylendiamin), 0,75 ml Triton-X-100 und 1,88 ml 96%-ige Essigsäure zugegeben. Zum Schluß wurden 225  $\mu\text{l}$  2%-iges Ammoniumperoxiddisulfat beigelegt.

Nach Entgasung des Gemisches wurde ein Flachgel gegossen, das mit Aqua dest. überschichtet über Nacht zur Polymerisation stehen gelassen wurde.

Vor dem Auftragen des Globins auf das Gel waren zwei Vorläufe notwendig:

1. Vorlauf: 1 Stunde, konstante Spannung von 200 V,  
Stromstärke 60 - 40 mA
2. Vorlauf: 45 Minuten, konstante Spannung von 150 V,  
Stromstärke 30 - 20 mA

Das Globin wurde in Probepuffer<sup>1</sup> gelöst in einer Konzentration von 5 mg/ml. Auf das Gel wurden je 10 - 15 µl der Probelösung aufgetragen. Auf einem Gel war Raum für 10 Proben nebeneinander.

Die Elektrophorese verlief in 5%-iger Essigsäure über 17 Stunden, bei konstanter Stromstärke von 8,5 mA und einer Spannung von 65 - 110 V.

#### 2.2.4 Färbung

Das Gel wurde für 30 Minuten in einer Coomassie-blue Färbelösung<sup>2</sup> fixiert und gefärbt und anschließend in Entfärbelösung<sup>3</sup> gelegt.

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten stellen sich als blaue Banden dar.

##### 1 Probepuffer

|                 |        |
|-----------------|--------|
| 8 M Harnstoff   | 5 ml   |
| Essigsäure      | 0,5 ml |
| Mercaptoethanol | 0,5 ml |
| Pyronin Y       | 2 mg   |

##### 2 Färbelösung

|                |        |
|----------------|--------|
| Coomassie blue | 0,5 g  |
| Methanol       | 300 ml |
| Eisessig       | 70 ml  |
| Aqua dest.     | 630 ml |

##### 3 Entfärbelösung

entspricht 1, ohne Coomassie blue

## 2.2.5 Bestimmung der Radioaktivität

Als Maß für die inkorporierte Radioaktivität in den einzelnen Banden diente der Grad der Schwärzung eines Röntgenfilms. Das getrocknete Gel wurde für 3 Monate in eine Röntgenkassette gelegt. Nach dieser Zeit hatte sich das Bandenmuster auf dem Röntgenfilm deutlich sichtbar abgebildet.

Die Auswertung erfolgte densitometrisch. Aus dem Röntgenfilm wurden die Bereiche mit dem Bandenmuster herausgeschnitten und im Spektralphotometer<sup>1</sup> bei 520 nm Wellenlänge gemessen, ein angeschlossenes Schreibgerät zeichnete die Densitometriewerte als Kurven auf.

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden erschienen als Peaks auf der Densitometriekurve. Die Fläche, die von den Peaks umgrenzt wurde, wurde auf schweres transparentes Kopierpapier aufgezeichnet, ausgeschnitten und auf einer Präzisionswaage<sup>2</sup> gewogen.

Aus dem Verhältnis der Gewichte der Flächen von  $\alpha$  und  $\beta$  ließ sich auf das Verhältnis der Radioaktivität in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden schließen und damit auf die relativen Syntheseraten für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globine.

<sup>1</sup> Model 25 Spectrophotometer, Beckman Instruments, München

<sup>2</sup> Firma Mettler, PT 1200

### 2.3 Gehalt an $\alpha$ - und $\beta$ -Globin in den Erythrozyten

Wie bei der Messung der Syntheserate wurden auch hier die Erythrozyten hämolysiert und das Globin präzipitiert wie unter 2.2.1 und 2.2.2. beschrieben.

Die elektrophoretische Trennung der Globine erfolgte ebenfalls nach der Methode von ROVERA (37) auf Tritonsäure-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelen, diesmal nicht in Form eines flachen Gels, sondern in einzelnen Röhrchen für je eine Probe.

Die Röhrchen konnten direkt densitometrisch ausgewertet werden, die Densitometriewerte des Bandenmusters wurden von einem Schreibgerät in Kurvenform aufgezeichnet. Die Flächen der  $\alpha$ - und  $\beta$ - Peaks wurden auf Kopierpapier übertragen und das Papier gewogen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Globinsyntheserate

Es wurde die relative  $\alpha$  - und  $\beta$ -Globinsyntheserate im peripheren Blut bei 20 Patientinnen mit heterozygoter  $\beta$ -Thalassämie bestimmt.

Nach der Trennung der Globine durch Gelelektrophorese und Färbung des Gels stellen sich die  $\alpha$  - und  $\beta$ -Fraktionen als deutlich erkennbare Banden auf dem Gel dar (Abb. 3.1)



Abb. 3.1  $\alpha$  - und  $\beta$ -Globinbanden nach gelelektrophoretischer Trennung und Färbung

In der Elektrophorese trennt sich das Globin der gesamten Erythrozyten der jeweiligen Probe in  $\alpha$  - und  $\beta$ -Globinketten

auf. Im Gegensatz dazu führen in der anschließenden autoradiographischen Auswertung des Elektrophoresegels nur die Globinketten zur Schwärzung des Röntgenfilms, die in vitro von den Retikulozyten synthetisiert wurden und daher das radioaktiv markierte Leucin enthalten. Abb. 3.2 zeigt ein Beispiel für die autoradiographische Darstellung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinketten.

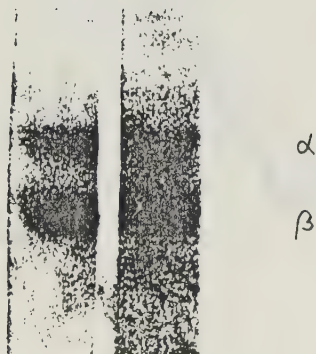


Abb. 3.2 Autoradiographische Darstellung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinketten.

Nach der Autoradiographie werden die  $\alpha$  - und  $\beta$  Banden, die sich auf dem Röntgenfilm abgebildet hatten, densitometriert (Abb. 3.3).

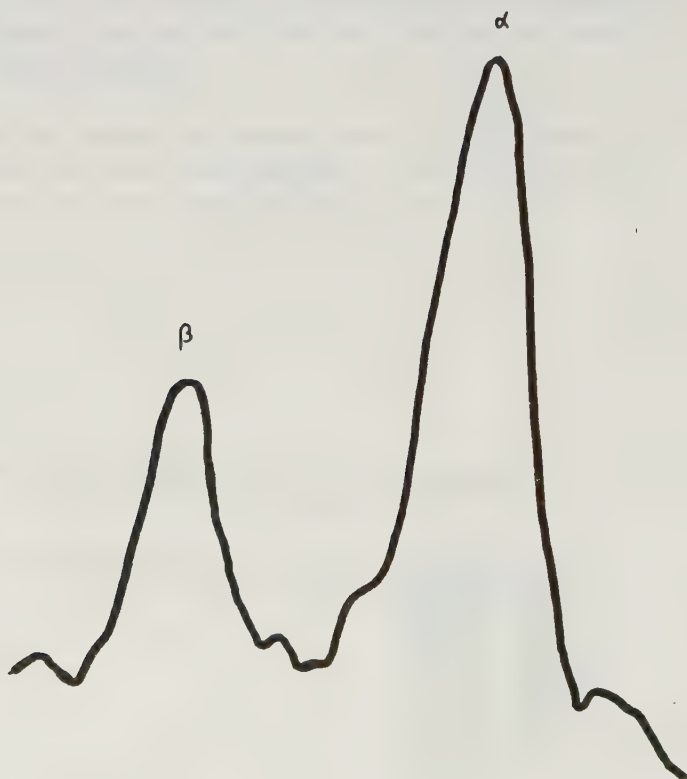


Abb. 3.3 Densitometrische Auswertung der  $\alpha$  - und  $\beta$ -Globinbanden nach Autoradiographie

Nach der densitometrischen Auswertung ergab sich aus den Flächen unter dem  $\alpha$  - und  $\beta$  -peak das Verhältnis der in  $\alpha$  - und  $\beta$ -Banden inkorporierten Radioaktivität.

Errechnet wurde das Verhältnis  $\beta/\alpha$  . Tabelle 3.1 zeigt die für die 20 Patientinnen ermittelten  $\beta/\alpha$  -Werte.

Tabelle 3.1

$\beta/\alpha$  -Globin-Syntheserate  
in den Retikulozyten

| Patientin | $\beta/\alpha$ -Syntheseverhältnis |
|-----------|------------------------------------|
| 1         | 0,62                               |
| 2         | 0,50                               |
| 3         | 0,45                               |
| 4         | 0,51                               |
| 5         | 0,51                               |
| 6         | 0,49                               |
| 7         | 0,55                               |
| 8         | 0,47                               |
| 9         | 0,71                               |
| 10        | 0,46                               |
| 11        | 0,44                               |
| 12        | 0,54                               |
| 13        | 0,58                               |
| 14        | 0,80                               |
| 15        | 0,53                               |
| 16        | 0,65                               |
| 17        | 0,36                               |
| 18        | 0,34                               |
| 19        | 0,44                               |
| 20        | 0,62                               |

### 3.2. Gehalt der Erythrozyten an $\alpha$ - und $\beta$ -Globin

Bei 17 der 20 Patientinnen wurden die Erythrozyten auf ihren Gehalt an  $\alpha$  - und  $\beta$ -Globin untersucht. Die elektrophoretisch getrennten  $\alpha$  - und  $\beta$ -Globinbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Abb. 3.4 zeigt ein Beispiel einer Densitometriekurve.

Es wurde wiederum das Verhältnis  $\beta/\alpha$  errechnet.

In Tabelle 3.2 sind die ermittelten Werte aufgeführt.

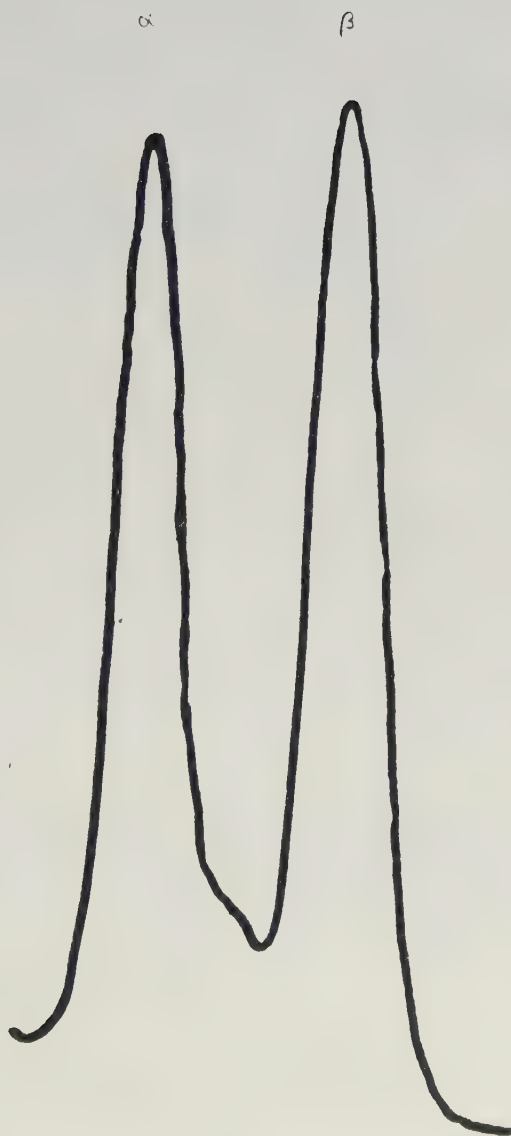


Abb.3.4 Densitometrische Auswertung der  $\alpha$  - und  $\beta$ -Globinbanden nach elektrophoretischer Trennung

Tabelle 3.2

$\beta/\alpha$  - Globingehalt der  
Erythrozyten

| Patientin | $\beta/\alpha$ -Verhältnis |
|-----------|----------------------------|
| 1         | 1,05                       |
| 2         | 0,99                       |
| 3         | 0,99                       |
| 4         | 0,86                       |
| 5         | 0,84                       |
| 6         | 0,93                       |
| 7         | 0,88                       |
| 8         | 0,95                       |
| 9         | 0,95                       |
| 10        | 0,95                       |
| 11        | 0,89                       |
| 12        | 0,92                       |
| 13        | 1,06                       |
| 14        | 0,94                       |
| 15        | 1,08                       |
| 16        | 0,85                       |
| 17        | 0,82                       |

#### 4. DISKUSSION

##### 4.1 Beurteilung der Meßmethode zur Bestimmung der Globinbiosynthese

Bei den 20 Patientinnen, bei denen wie beschrieben die relative Globinsyntheserate bestimmt wurde durch in vitro Proteinsynthese mit radioaktiv markierten Aminosäuren, elektrophoretischer Auftrennung der Globine und Autoradiographie, war bereits vorher die Diagnose der heterozygoten  $\beta$  - Thalassämie gesichert. Im Rahmen einer genetischen Beratung war die relative Globinsyntheserate nach in vitro Proteinsynthese durch säulenchromatographische Globintrennung und Messung der Radioaktivität im Scintillationszähler ermittelt worden, wie von CLEGG et al. (11, 12) beschrieben. Dabei ergaben sich Werte für das  $\beta/\alpha$  - Verhältnis zwischen 0,3 und 0,8, die alle auf einen heterozygoten Zustand hinweisen.

Das Anliegen dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die elektrophoretische Trennung der Globine mit anschließender Autoradiographie (Methode 1) vergleichbar zuverlässige Werte liefert wie das Verfahren der Säulenchromatographie mit anschließender Messung der Radioaktivität im Scintillationszähler (Methode 2).

In der Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Methode 1 den Ergebnissen der Methode 2 gegenübergestellt.

Abbildung 4.1 zeigt die Regressionsgerade, die sich aus den Wertepaaren von Methode 1 und Methode 2 ergibt.

Tabelle 4.1

 $\beta/\alpha$  -Globin-Syntheseverhältnis

| Patientin | Bestimmung mittels<br>Elektrophorese und<br>Autoradiographie | Bestimmung mittels<br>SKulenchromatographie<br>und Szintillations-<br>zähler |
|-----------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | 0,62                                                         | 0,54                                                                         |
| 2         | 0,50                                                         | 0,43                                                                         |
| 3         | 0,45                                                         | 0,38                                                                         |
| 4         | 0,51                                                         | 0,45                                                                         |
| 5         | 0,51                                                         | 0,56                                                                         |
| 6         | 0,49                                                         | 0,41                                                                         |
| 7         | 0,55                                                         | 0,64                                                                         |
| 8         | 0,47                                                         | 0,32                                                                         |
| 9         | 0,71                                                         | 0,61                                                                         |
| 10        | 0,46                                                         | 0,42                                                                         |
| 11        | 0,44                                                         | 0,47                                                                         |
| 12        | 0,54                                                         | 0,57                                                                         |
| 13        | 0,58                                                         | 0,65                                                                         |
| 14        | 0,80                                                         | 0,71                                                                         |
| 15        | 0,53                                                         | 0,38                                                                         |
| 16        | 0,65                                                         | 0,73                                                                         |
| 17        | 0,36                                                         | 0,31                                                                         |
| 18        | 0,34                                                         | 0,46                                                                         |
| 19        | 0,44                                                         | 0,56                                                                         |
| 20        | 0,62                                                         | 0,56                                                                         |

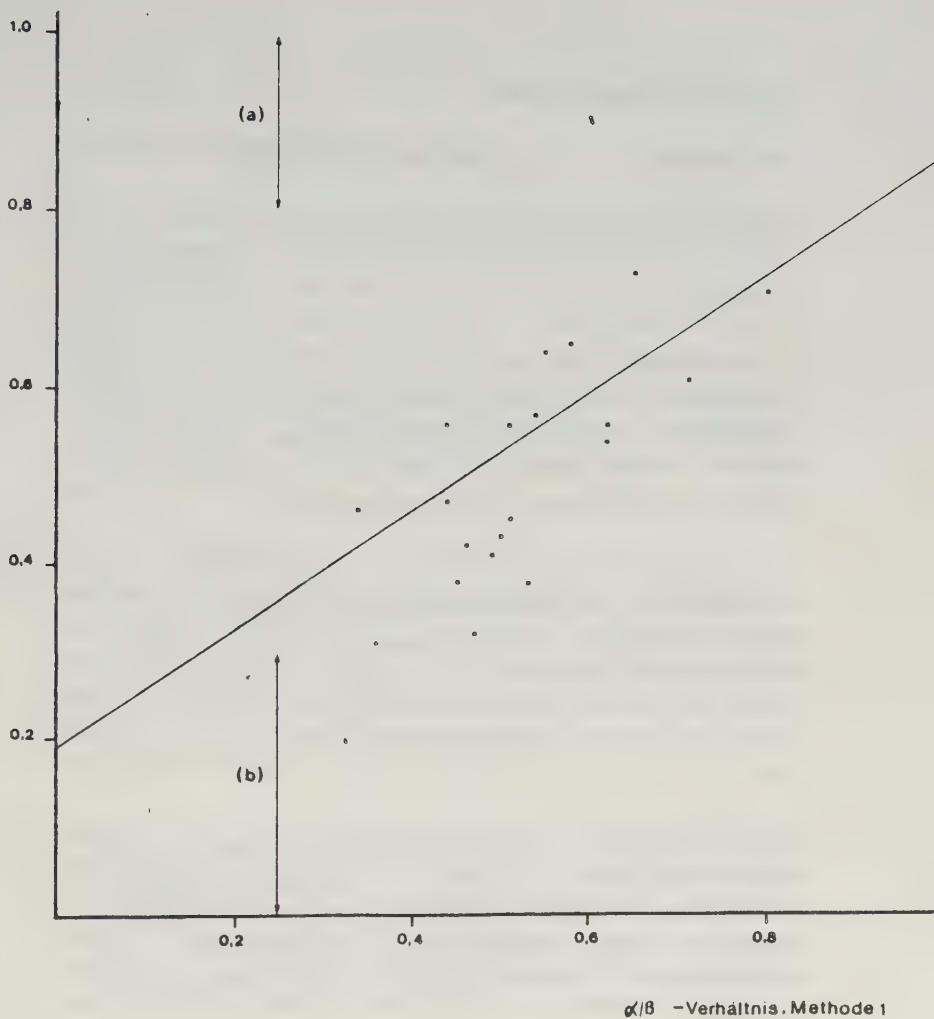


Abb.4.1 Korrelation der Bestimmung des  $\beta/\alpha$  - Verhältnisses mittels Elektrophorese und Autoradiographie (Methode 1) und mittels Säulenchromatographie (Methode 2)

(a) Streubereich der  $\beta/\alpha$  - Werte beim Gesunden nach Methode 2

(b) Streubereich der  $\beta/\alpha$  - Werte beim homozygot Kranken nach Methode 2

Die Regressionsgerade lautet

$$\beta/\alpha \text{ (Methode 1)} = 0,677 \times \beta/\alpha \text{ (Methode 2)} + 0,187$$

Der Korrelationskoeffizient errechnet sich zu:

$$R = 0,74$$

Es ergibt sich, daß sich der relative Anteil der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinketten nach in vitro Proteinsynthese zuverlässig mittels Elektrophorese und Autoradiographie bestimmen läßt. Es ist möglich, anhand dieser Ergebnisse die Diagnose der heterozygoten Thalassämie eindeutig zustellen.

Die Anwendung der Säulenchromatographie zur Auftrennung der Globine erfordert eine aufwendige, teure Apparatur, kontinuierliche Überwachung und erfahrenes Personal. Es können jeweils nur wenige Proben pro Ansatz untersucht werden, meist nicht mehr als zwei, wenn die Apparatur nur einmal vorhanden ist.

Dagegen ist die elektrophoretische Trennung der Globine einfacher und schneller durchführbar. Auf ein Gel können 10 , gegebenenfalls 20 Proben aufgetragen werden. Die anschließende Auswertung der inkorporierten Radioaktivität durch Autoradiographie erfordert lediglich eine Röntgenkassette mit Film.

Einschränkend muß man feststellen, daß die inkorporierte radioaktive Strahlung erst nach einem langen Zeitraum zu einer Schwärzung des Röntgenfilms führt. Mehrere Versuchsansätze ergaben, daß dazu drei Monate notwendig sind. Erst dann zeichnen sich die Banden auf dem Film so deutlich ab, daß sie

mit dem Densitometer auswertbar werden.

In der Diagnostik der Thalassämie ist diese Methode daher nicht anwendbar, wenn schnell eine Diagnose gestellt werden muß. Sie bleibt aber eine Alternative in Fällen, wo der Zeitfaktor im Hintergrund steht und Kostenersparnis und geringerer Aufwand eine Rolle spielen. Ein Beispiel sind Screening - Untersuchungen in Populationen mit hoher Inzidenz an Thalassämie, bei denen unklare Fälle bleiben, die durch die Untersuchung der Globinbiosyntheseraten abgeklärt werden müssen (9).

CLEGG et al entwickelten ihre Methode der säulenchromatographischen Trennung von Globinen ursprünglich zur Untersuchung von Hämoglobinvarianten (11, 12). Die Globinketten der Hämoglobinvarianten machen bei heterozygoter Vererbung die Hälfte der  $\alpha$  - oder nicht -  $\alpha$  - Ketten aus (7). Es wäre zu erwarten, daß diese Menge ausreicht, um sich auch autoradiographisch darstellen zu lassen.

Dagegen ist eine autoradiographische Auswertung der Radioaktivität ungeeignet zur Klassifizierung verschiedener Thalassämieformen, bei der auch die Synthese von  $\delta$  - und  $\gamma$  - Globinen interessiert.  $\delta$  - und  $\gamma$  - Ketten werden in viel geringerer Menge gebildet und würden zu wenig Radioaktivität inkorporieren, um sich auf dem Röntgenfilm abzubilden.

Im Gegensatz zur homozygoten Thalassämie sind bei der heterozygoten Form die Retikulozytenzahlen in der Regel nicht erhöht (48). Eine Anreicherung der Retikulozyten durch Zentrifugation vor der in vitro Proteinsynthese (39, 47) würde die Menge an inkorporierter Radioaktivität erhöhen und eventuell zu einer Verbesserung der Auswertbarkeit der Autoradiographie beitragen. Andererseits stellt eine Differentialzentrifugation einen hohen technischen Aufwand

dar. Der große Vorteil der autoradiographischen Bestimmung der Globinbiosyntheseraten, die einfache Durchführbarkeit, wäre damit eingeschränkt.

#### 4.2 Vergleich zwischen Globingehalt und Globinsynthese der Erythrozyten

Bei 17 der 20 Patientinnen wurde neben der Globinbiosyntheserate in den Retikulozyten auch der Gehalt an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globinen in den Erythrozyten bestimmt. Tabelle 4.2 zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse.

Während bei der Globinbiosynthese in den Retikulozyten das  $\beta/\alpha$ -Verhältnis deutlich kleiner als eins ist (im Durchschnitt 0,5), findet sich bei der Untersuchung der reifen Erythrozyten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globin in etwa gleicher Menge (im Durchschnitt 0,94).

Der Korrelationskoeffizient errechnet sich zu

$$R = - 0,07$$

Es ist keine Korrelation zwischen Syntheseleistung und Gesamtglobingehalt festzustellen.

Es stellt sich die Frage, wie dieser Unterschied zu erklären ist, da eigentlich eine überschüssige  $\alpha$ -Globinsynthese zu vermehrt nachweisbarem  $\alpha$ -Globin in den Erythrozyten führen müßte.

Untersuchungen der Globinbiosynthese an den Erythrozytenvorläufern im Knochenmark (10, 50) ergaben, daß

Tabelle 4.2

Gegenüberstellung der Meßergebnisse für das  $\beta/\alpha$  - Verhältnis des Globingehalts der Erythrozyten und der Globinsynthese in den Retikulozyten - Bestimmung der Globinsyntheserate nach der Methode von CLEGG et al. (10)

| Patientin | Globingehalt | Globinsynthese |
|-----------|--------------|----------------|
| 1         | 1,05         | 0,54           |
| 2         | 0,99         | 0,43           |
| 3         | 0,99         | 0,38           |
| 4         | 0,86         | 0,45           |
| 5         | 0,84         | 0,56           |
| 6         | 0,93         | 0,41           |
| 7         | 0,88         | 0,64           |
| 8         | 0,95         | 0,32           |
| 9         | 0,95         | 0,61           |
| 10        | 0,95         | 0,42           |
| 11        | 0,89         | 0,47           |
| 12        | 0,92         | 0,57           |
| 13        | 1,06         | 0,65           |
| 14        | 0,94         | 0,71           |
| 15        | 1,08         | 0,38           |
| 16        | 0,85         | 0,73           |
| 17        | 0,82         | 0,31           |

dort ebenso wie bei den reiferen Retikulozyten des peripheren Blutes eine unbalancierte  $\alpha$ ,  $\beta$  - Globinsynthese beobachtet werden kann. Es finden sich bereits in den jüngsten Erythrozytenvorläufern freie, nicht an  $\beta$ - Ketten gebundene  $\alpha$  - Ketten (15, 19). Jedoch konnte nachgewiesen werden, daß die überschüssigen  $\alpha$  - Ketten in kürzester Zeit durch Proteolyse abgebaut werden (8) und damit einem relativen Überschuß an  $\alpha$  - Ketten entgegengewirkt wird.

Ein deutlicher Überschuß an  $\alpha$  - Ketten, wie man ihn bei der homozygoten  $\beta$  - Thalassämie findet, bei der das  $\beta/\alpha$  - Ungleichgewicht bei der Synthese bis zu 1 : 20 betragen kann, bzw. überhaupt keine  $\beta$  - Kettensynthese stattfindet (48), führt zur Bildung von Einschußkörperchen in den Zellen (15, 16). Diese spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Anämie der  $\beta$  - Thalassämie. Durch die Einschußkörperchen kommt es zur Zellmembranschädigung (20) und zur vorzeitigen Zellerstörung (32, 33). Es resultiert eine ineffektive Erythropoese im Knochenmark (17) und eine verkürzte Erythrozytenüberlebenszeit durch vorzeitigen Abbau in der Milz (40, 43).

Bei Patienten mit heterozygoter  $\beta$  -Thalassämie kann das  $\beta/\alpha$  - Ungleichgewicht durch den proteolytischen Abbau von  $\alpha$  - Globin im Knochenmark noch hinreichend kompensiert werden. Bei ihnen spielen Einschußkörperchen nur eine geringe Rolle(50), und die Erythrozytenüberlebenszeit ist beinahe normal (29, 36). Damit im Einklang stehen unsere Ergebnisse eines ausgewogenen  $\beta/\alpha$  -Verhältnisses in den reifen Erythrozyten.

Nach CHALEVELAKIS et al. (10) ist die proteolytische Aktivität in den unreifen Erythrozytenvorstufen im Knochenmark größer als in den Retikulozyten, so daß in den Retikulozyten das  $\beta/\alpha$ -Syntheseverhältnis weniger ausgeglichen werden kann. Da jedoch die Globinsynthese zu 99% im Knochenmark stattfindet und nur

zu etwa 1% im peripheren Blut (6), fällt der Überschuß an  $\alpha$ -Ketten in den Retikulozyten, der dort nicht wie im Knochenmark kompensiert wird, wenig ins Gewicht.

Bei der Untersuchung der Erythrozyten des peripheren Blutes auf ihren  $\alpha$  - und  $\beta$  - Globingehalt findet man daher ein ausgewogenes  $\alpha, \beta$  -Verhältnis, das nicht der tatsächlichen Syntheseleistung entspricht. Die Diagnose der heterozygoten  $\beta$  - Thalassämie kann nicht anhand einer solchen Untersuchung gestellt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die relative Syntheserate für  $\alpha$  - und  $\beta$  - Globin in Retikulozyten wurde bestimmt nach in vitro Proteinsynthese mit radioaktiv markierten Aminosäuren. Die Auftrennung der Globine erfolgte durch Elektrophorese, anschließend wurde die inkorporierte Radioaktivität autoradiographisch ausgewertet. Diese Methodenkombination wurde verglichen mit der alternativen Kombination der Säulenchromatographischen Globintrennung mit Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler.

Es ergab sich eine signifikante Korrelation der Ergebnisse beider Methoden mit einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,74$ . Die Kombination von Elektrophorese und Autoradiographie stellt daher eine alternative Möglichkeit zu dem sonst üblicherweise angewandten, sehr aufwendigen Verfahren der Säulenchromatographie dar.

Des Weiteren wurde der Gehalt der Erythrozyten an  $\alpha$  - und  $\beta$  - Globin nach elektrophoretischer Globinauftrennung mit den Globinbiosyntheseraten der Retikulozyten verglichen. Die Gegenüberstellung der Werte für die  $\beta/\alpha$  - Quotienten ließ bei einem Korrelationskoeffizienten von  $R = -0,07$  keinen Zusammenhang erkennen. Die Bestimmung des  $\alpha, \beta$  - Globingehalts der Erythrozyten ist daher für die Diagnostik der  $\beta$  - Thalassämie nicht geeignet.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alter, B.P.; Orkin, S.H.; Forget, B.G.; Nathan, D.G.:  
Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies and other  
hematologic diseases.  
J.Pediatr. 95, 501, 1979
- 2) Alter, B.P.; Orkin, S.H.; Forget, B.G.; Nathan, D.G.:  
Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. The New England  
approach.  
Ann. NY. Acad. Sci. 344, 151, 1980
- 3) Bank, A.; Marks, P.A.: Excess  $\alpha$  - chain synthesis  
relative to  $\beta$  - chain synthesis in thalassemia major and  
minor.  
Nature 212, 1198, 1966
- 4) Bargellesi, A; Poutremoli, S.; Conconi, F.: Absence of  $\beta$  -  
globin synthesis in homozygous  $\beta$  - thalassemia.  
Eur.J.Biochem. 1, 73, 1967
- 5) Benz, E.J.; Forget, B.G.: The biosynthesis of hemoglobin  
Sem.Hematol. 11, 463, 1974
- 6) Borsook, H.; Lingrel, J.B.; Soaro, J.L.; Milette, R.L.:  
Synthesis of haemoglobin in relation to the maturation of  
erythroid cells  
Nature 196, 347, 1962
- 7) Bunn, H.F.; Forget, B.G.; Ranney, H.M.: Human hemoglobins  
W.B. Saunders Company, Philadelphia/London/Toronto, 1977

- 8) Bravermann, A.S.; Lester, D.: Evidence for increased proteolysis in intact  $\beta$  - thalassemia erythroid cells. Hemoglobin 5 (6), 549, 1981
- 9) Cao, A.; Furbetta, M.; Galanello, R.; Melis, M.; Angius, A.; Ximenes, A.; Rosatelle, C.; Ruggeri, R.; Addis, M.; Tuveri, T.; Falchi, A.; Paghetti, E.; Scalas, M.: Prevention of homozygous  $\beta$  - thalassaemia by carrier screening and prenatal diagnosis in Sardinia. Am.J.Hum.Genet. 33, 592, 1981
- 10) Chalevelakis, G.; Clegg, J.B.; Weatherall, D.J.: Imbalanced globin chain synthesis in heterozygous  $\beta$  - thalassaemic bone marrow. Proc.Nat.Acad.Sci. 72, 3853, 1975
- 11) Clegg, J.B.; Naughton, M.A.; Weatherall, D.J.: An improved method for the characterization of human haemoglobin mutants: identification of  $\alpha_2\beta_2$  - haemoglobin N (Baltimore). Nature 207, 945, 1965
- 12) Clegg, J.B.; Naughton, M.A.; Weatherall, D.J.: Abnormal human haemoglobins: separation and characterization of the  $\alpha$  - and  $\beta$  - chains by chromatography, and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). J.Mol.Biol. 19, 91, 1966
- 13) Clegg, J.B.; Weatherall, D.J.: Haemoglobin synthesis during erythroid maturation in  $\beta$  thalassaemia. Nature 240, 190, 1972

- 14) Conconi, F.; Bargellesi, A.; Del Semo, A.; Menegati, E.; Poutremoli, S.; Russo, G.: Globin chain synthesis in Sicilian thalassaemia subjects.  
Br.J.Haematol. 19, 469, 1970
  
- 15) Fessas, P.: Inclusions of hemoglobin in erythroblasts and erythrocytes of thalassaemia.  
Blood 21, 21, 1963
  
- 16) Fessas, P.; Loukopoulos, D; Kaltsoya, A.: Peptide analysis of the inclusions of erythroid cells in  $\beta$  - thalassaemia.  
Biochim.Biophys.Acta 124, 430, 1966
  
- 17) Finch, C.A.; Deubelbeiss, K.; Cook, J.D. et al.: Ferrokinetics in man.  
Medicine 49, 17, 1970
  
- 18) Galanello, R.; Melis, M.A.; Mironi, P.P.; Cao, A.: Quantification of Hb A<sub>2</sub> with DE-52 in whole blood as screening test for  $\beta$  - thalassemia in heterozygotes.  
Acta Haematol. 52, 32, 1977
  
- 19) Gill, F.M.; Schwartz, E.: Free  $\alpha$  - globin pool in human bone marrow.  
J.Clin.Invest. 52, 3057, 1973
  
- 20) Gunn, R.B.; Silvers, D.N.; Rosse, W.F.: Potassium permeability in  $\beta$  - thalassemia minor red blood cells.  
J.Clin.Invest. 51, 1043, 1972
  
- 21) Heywood, J.D.; Karon, M.; Weissmann, S.: Amino acids: incorporation into  $\alpha$  - and  $\beta$  - chains of hemoglobin by normal and thalassemic reticulocytes.  
Science 146, 530, 1964

- 22) Heywood, J.D.; Karon, M.; Weissmann, S.J.: Asymmetrical incorporation of amino acids in the  $\alpha$  - and  $\beta$  chains of hemoglobin synthesized by thalassemic reticulocytes.  
J.Lab.Clin.Med. 66, 476, 1965
  
- 23) Jensen, M.: Die pränatale Diagnostik der  $\beta$  - Thalassämie.  
Habilitationsschrift, München, 1977
  
- 24) Kan, Y.W.; Nathan, D.J.; Lodish, H.F.: Equal synthesis of  $\alpha$  - and  $\beta$  - globin chains in erythroid precursors in heterozygous  $\beta$  - thalassemia.  
J.Clin.Invest. 51, 1906, 1972
  
- 25) Kattamis, C.; Panayotis, C.; Metaxotou-Mavromati, A.; Matsaniotis, N.: Serum iron and unsaturated iron-binding capacity in the thalassaemia trait; their relation to the levels of hemoglobins A, A<sub>2</sub>, and F.  
J.Med.Genet. 9, 154, 1972
  
- 26) Kattamis, C.; Metaxotou-Mavromati, A.; Wood, W.G. ; Nach, J.R.; Weatherall, D.J.: The heterogeneity of normal Hb A<sub>2</sub>  $\beta$ - thalassaemia in Greece.  
Br.J.Haematol. 42, 109, 1979
  
- 27) Kessenaar, A.; Morell, H.; London, I.M.: The incorporation of glycine into globin and the synthesis of heme in vitro in duck erythrocytes.  
Biol.Chem. 229, 423, 1957
  
- 28) Kruh, J.; Borsook, H.: Hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes in vitro.  
J.Biol.Chem. 220, 905, 1956

- 29) Malamos, B.; Belcher, E.H.; Gyftaki, E.; Binopoulos, D:  
Simultaneous radioactive tracer studies of erythropoiesis  
and red cell destruction in thalassemia.  
Br.J.Haematol. 7, 411, 1961
  
- 30) Marks, P.A.; Rifkind, R.A.; Danon, D.: Polyribosomes and  
protein synthesis during erythroid maturation in vitro.  
Proc.Nat.Acad.Sci. 50, 336, 1963
  
- 31) Marks, P.A.; Burka, E.R.: Hemoglobin synthesis in human  
reticulocytes, a defect in globin formation in thalassemia  
major.  
Ann.NY.Acad.Sci. 119, 513, 1964
  
- 32) Nathan, D.G.; Gunn, R.B.: Thalassemia - the consequences  
of unbalanced hemoglobin synthesis.  
Am.J.Med. 41, 815, 1966
  
- 33) Nathan, D.G.; Stossel, T.B.; Gunn, R.B. et al.: Influence  
of hemoglobin precipitation on erythrocyte metabolism in  
 $\alpha$  - and  $\beta$  - thalassemia.  
J.Clin.Invest. 48, 33, 1969
  
- 34) Nathan, D.G.; Alter, B.P.: Antenatal diagnosis of the  
hemoglobinopathies.  
Br.J.Haematol. 31 (Suppl), 143, 1975
  
- 35) Nienhuis, A.W.; Canfield, P.H.; Anderson, W.F.: Hemoglobin  
messenger RNA from human bone marrow isolation and  
translation in homozygous and heterozygous  $\beta$  -  
thalassemia.  
J.Clin.Invest. 52, 1735, 1973

- 36) Pearson, H.A.; McFarland, W.; King, E.R.: Erythrokinetic studies in thalassemia trait.  
J.Lab.Clin.Med. 56, 866, 1960
- 37) Rovera, G.; Magarian, C. Borum, T.W.: Resolution of hemoglobin subunits by electrophoresis in acid urea polyacrylamide gel containing Triton-X-100.  
Anal.Biochem. 85, 506, 1978
- 38) Schwartz, E.: The silent carrier of  $\beta$  - thalassemia.  
N.Engl.J.Med 281, 506, 1978
- 39) Schwartz, E.: Heterozygous  $\beta$  - thalassemia: balanced globin synthesis in bone marrow cells.  
Science 167, 1513, 1970
- 40) Schwartz, E.: Abnormal globin synthesis in thalassemic red cells.  
Sem.Haematol. 11(4), 549, 1970
- 41) Silvestroni, E.; Bianco, I.; Graziani, B.; Carboni, C.; D'Arca, S.U.: First premarital screening of thalassaemia carriers in intermediate schools in Latinum.  
J.Med.Genet. 15,202,1978
- 42) Stamatoyannopoulos, G.: Problems of screening and counseling in the hemoglobinopathies.  
Proceedings of the IV. International Conference on Birth Defects, Vienna, 268, 1973
- 43) Sturgeon, P.; Finch, C.A.: Erythrokinetics in Cooley's anemia.  
Blood 13, 803, 1958

- 44) Vullo, C.; Tunioli, A.M.: Survival studies of thalassemic erythrocytes transfused into donors, subjects with thalassemia minor and into normal and splenectomized subjects.  
Blood 13, 803, 1958
- 45) Wasi, P.; Disthasongchan, P; Na-Nahorn, S.: The effect of iron deficiency on the levels of hemoglobins A<sub>2</sub> and E.  
J.Lab.Clin.Med. 71, 85, 1968
- 46) Weatherall, D.J.; Clegg, J.B.; Naughton, M.A.: Globin synthesis in thalassaemia: an in vitro study.  
Nature 208, 1061, 1965
- 47) Weatherall, D.J.; Clegg, J.B.: The pattern of disordered haemoglobin synthesis in homozygous and heterozygous  $\beta$  - thalassaemia.  
Br.J.Haematol. 16, 251, 1969
- 48) Weatherall, D.J.; Clegg, J.B.: The thalassaemia syndromes, 3. ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1981
- 49) Wood, W.G.; Stamatoyannopoulos, G.: Globin synthesis in fractionated normoblasts of  $\beta$  - thalassaemia heterozygotes.  
J.Clin.Invest. 55, 567, 1975
- 50) Yatanagas, X.; Fessas, P.: The pattern of hemoglobin precipitation in thalassaemia and its significance.  
Ann.NY.Acad.Sci. 165, 270, 1969

## LEBENS LAUF

|                                   |                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19.9.1960                         | geboren in Seoul, Korea                                                                                                                           |
| Vater                             | Diplomkaufmann Dr. Reinhard Weißgerber                                                                                                            |
| Mutter                            | Dolmetscherin Erica Weißgerber, geb. Meyer                                                                                                        |
| 1966 - 1970                       | Haimhauser Volksschule, München                                                                                                                   |
| 1970 - 1979                       | St. Anna Gymnasium, München                                                                                                                       |
| August bis<br>Dezember 1975       | Internataufenthalt in der Gordonstoun School<br>in Elgin, Schottland                                                                              |
| Mai 1979                          | Abitur                                                                                                                                            |
| 1980 - 1986                       | Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-<br>Universität in München                                                                               |
| August bis<br>Oktober 1983        | Famulatur am Baylor University Medical Center<br>Dallas, Texas, in der Radiologieabteilung und<br>am Lakewood Medical Center                      |
| April bis<br>Juli 1985            | Internistischer Teil des Praktischen Jahres<br>in der III. Medizinischen Klinik, Klinikum<br>Großhadern                                           |
| August bis<br>November 1985       | Pädiatrischer Teil des Praktischen Jahres<br>am Royal Hospital For Sick Children, Glasgow                                                         |
| Dezember 1985 bis<br>Februar 1986 | Chirurgischer Teil des Praktischen Jahres<br>in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik,<br>Nußbaumstraße                                         |
| 1. Juli 1986                      | Approbation                                                                                                                                       |
| Juli 1986                         | Amerikanisches Staatsexamen<br>(Foreign Medical Graduate Examination in the<br>Medical Sciences)                                                  |
| Seit Dezember 1986                | als wissenschaftliche Hilfskraft (Stelle<br>der Deutschen Forschungsgemeinschaft) in der<br>III. Medizinischen Klinik des Klinikums<br>Großhadern |







